

بررسی بیوانفورماتیکی میانکنش بین میکرو RNA ها با ژن‌های دخیل در عود مجدد سرطان پستان درمان شده با تاموکسیفن

دکتر شهین رمازی^۱، الهام ایزی^۲، دکتر علی فصیحی^۱، پیام قاسمی دهکردی^۳

نویسنده‌ی مسئول: مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، سبزوار shahinramazi@yahoo.com

دریافت: ۹۵/۱/۲۳ پذیرش: ۹۶/۴/۲۸

چکیده

زمینه و هدف: تاموکسیفن رایج‌ترین درمان مورد استفاده برای بیماران مبتلا سرطان پستان نوع ER^+ محسوب می‌شود که مانع از بیان ژن‌های موثر در رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی توسط استروژن می‌گردد. مقاومت به تاموکسیفن یک مشکل بالینی مهم در سرطان پستان به شمار می‌رود، در بررسی‌های جدید نقش میکرو RNA ها در مقاومت به تاموکسیفن، از طریق تاثیر بر تنظیم ژن‌های کنترل‌کننده‌ی چرخه سلولی، مطرح شده است. در این مقاله میانکنش میکرو RNA ها با ژن‌های دخیل در مقاومت به تاموکسیفن مورد بررسی قرار گرفته است.

روش بررسی: با بررسی داده‌های بیان ژن در نمونه‌های بیماران حساس و مقاوم به تاموکسیفن که از پایگاه داده GEO دریافت شده بود و جستجو در پایگاه مقالات، ژن‌ها و میکرو RNA هایی که داری تغییرات بیانی معنی‌دار بودند تعیین گردیدند. سپس با بررسی همبستگی بین بیان ژن‌ها و میکرو RNA ها و همچنین بررسی بیوانفورماتیکی به وسیله نرم‌افزار mirwalk شبکه میانکنشی بین ژن‌ها و میکرو RNA ها ترسیم گردید.

یافته‌ها: بررسی‌ها نشان دادند ۲۱ ژن و ۶۲ میکرو RNA در نمونه‌های مقاوم به تاموکسیفن تغییر بیان یافته‌اند که $miR342-3P/5P$ با هدف قرار دادن ژن‌های $PRM2$ ، $HOXB13$ و $KLK3$ و میکرو RNA های $miR-520h$ و $miR-582-5p$ با هدف قرار دادن ۵ ژن کاهش بیان یافته، می‌توانند بیشترین نقش را در عود مجدد سرطان پستان ایفا نمایند.

نتیجه‌گیری: شبکه‌ی تنظیمی ترسیم شده بین مجموعه‌ای از ژن‌ها و میکرو RNA هایی که به‌صورت بالقوه در عود مجدد سرطان پستان درمان شده با تاموکسیفن، دارای نقش می‌باشند، می‌تواند روشن کننده نقش میکرو RNA ها در بازگشت مجدد سرطان پستان باشد.

واژگان کلیدی: سرطان پستان، تاموکسیفن، عود مجدد، شبکه میانکنشی، میکرو RNA، بیوانفورماتیک

مقدمه

امروزه سرطان پستان شایع‌ترین سرطان در میان زنان دنیا می‌باشد و مرگ ناشی از آن بیشترین میزان مرگ و میر ناشی از سرطان را در زنان تشکیل می‌دهد (۱). این سرطان وابسته به هورمون است و استروژن نقش عمده‌ای در شروع و پیشرفت این بیماری دارا می‌باشد. عملکرد بیولوژیک استروژن به واسطه رسپتور استروژن (ER) صورت می‌گیرد. از آنجا که در ۷۰ درصد موارد سرطان پستان بیان ER، رسپتور پروسترون (PR) و محصولات ژن‌های وابسته به ER و

۱- دکترای تخصصی ژنتیک، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، سبزوار

۲- کارشناسی ارشد، سلولی و تکوینی گیاهی، مرکز تحقیقات طب سنتی، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، سبزوار

۳- کارشناسی ارشد ژنتیک، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد

قرار گرفته است. در طی سال‌های ۲۰۰۸ تا ۲۰۱۵ محققان با بررسی سلول‌های مقاوم و حساس به تاموکسیفن میکرو RNA های مختلفی را که در بیماران مقاوم به تاموکسیفن، تغییرات بیانی نشان داده‌اند شناسایی نموده‌اند (۱۶-۱۳). همچنین در طی دو مطالعه مختلف در سال‌های ۲۰۰۴ و ۲۰۰۸ ژن‌هایی که در مقاومت به تاموکسیفن دارای نقش می‌باشند مورد بررسی قرار گرفته‌اند (۱۷ و ۱۸). در سال ۲۰۱۴ با بررسی‌های بیوانفورماتیکی شبکه میانکنشی ژن‌های دخیل در مقاومت به تاموکسیفن که توسط miR-519a تنظیم می‌گردند ترسیم شده‌اند (۱۹). در سال ۲۰۱۶ نیز با بررسی بیان ژن‌ها در سه رده‌ی سلولی مقاوم به تاموکسیفن، ژن‌ها و میکرو RNA های دخیل در مقاومت به تاموکسیفن مورد بررسی قرار گرفته‌اند (۲۰). اما با وجود بررسی‌های جداگانه‌ای که برای شناسایی miRNA ها و ژن‌های دخیل در مقاومت به تاموکسیفن صورت گرفته است تاکنون مطالعه‌ای به‌صورت جامع ارتباط بین میکرو RNA ها و ژن‌های فوق را مورد بررسی قرار نداده است. از آنجایی که اولین مرحله در شناسایی عملکرد میکرو RNA ها در تنظیم پدیده‌های زیستی، پیش‌بینی اهداف بالقوه‌ی آن‌ها و سپس ترسیم شبکه‌های میانکنشی تنظیمی برای آن‌ها بر اساس الگوهای بیوانفورماتیکی می‌باشد (۲۱)، در این مقاله سعی گردیده است میانکنش‌های بین میکرو RNA ها و ژن‌هایی که می‌تواند سبب بروز مقاومت در سرطان پستان به تاموکسیفن شود، بررسی گردد تا میکرو RNA هایی که به‌صورت بالقوه می‌توانند در تنظیم بیان ژن‌های دخیل در مقاومت به تاموکسیفن در سرطان پستان دارای نقش باشند شناسایی شوند و امکان شناخت بهتر مکانیسم میکرو RNA ها در بروز مقاومت به تاموکسیفن فراهم آید.

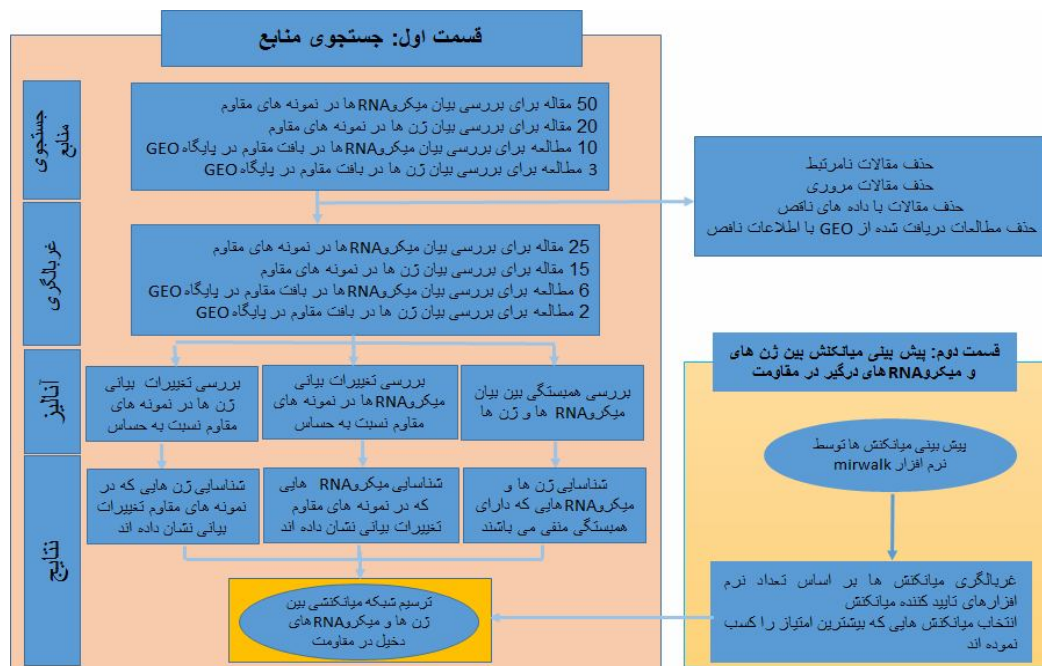
روشن‌بررسی

در این مقاله پژوهشی در مرحله اول برای دریافت داده‌ها

همچنین ژن‌های پاسخگو به استروژن افزایش یافته است (۲)، بنابراین هدف قرار دادن ER با استفاده از آنتاگونیست ER یا آنتی‌استروژن‌ها یک اقدام درمانی قابل قبول در تمام مراحل این بیماری است (۳) و استفاده از تاموکسیفن به‌عنوان آنتاگونیست گیرنده استروژن در سلول‌های سرطانی پستان دارای گیرنده استروژن (ER+), جایگاه ویژه‌ای دارد (۴). تاموکسیفن از طریق اتصال به کمپلکس ER, اثرات استروژن که شامل بیان ژن‌های موثر در رشد و تکثیر سلولی است را مهار می‌کند (۵). ولی با وجود پیشرفت‌های حاصل شده بخش قابل توجهی از زنان به دلیل مقاومت ذاتی یا اکتسابی به تاموکسیفن، مراحل پیشرفته‌ی بیماری را تجربه می‌کنند (۶) و این مقاومت همچنان به‌عنوان یک مانع در درمان سرطان پستان وابسته به هورمون باقی مانده است، در حال حاضر بیش از یک سوم از بیماران در آغاز درمان به تاموکسیفن مقاوم هستند و اکثر بیمارانی که در ابتدا به تاموکسیفن پاسخ می‌دهند نیز بعد از آن مقاوم می‌شوند. برخی از مکانیسم‌های مقاومت ممکن است شامل تغییر در بیان ER α یا ER β , تغییر در پروتئین‌های تنظیمی مشترک و تغییر در مسیرهای انتقال سیگنال، تغییر بیان میکرو RNA های خاص، و پلی‌مورفیسم ژنتیکی دخیل در فعالیت متابولیک تاموکسیفن باشد (۷-۹). مطالعات اخیر نقش کلیدی میکرو RNA ها را در تنظیم همه‌ی فرایندهای اساسی سلولی در حیوانات و گیاهان نشان داده است (۱۰). این RNA های غیر کد کننده کوچک از طریق مهار ترجمه mRNA و در برخی موارد از طریق تخریب mRNA بیان ژن‌های هدف خود را کنترل می‌کنند (۱۱). انواع بسیار زیادی از میکرو RNA ها در سلول‌ها و بافت‌های مختلف بدن وجود دارد و نقش بسیار مهمی را در بسیاری از فرایندهای بیولوژیک و تمایز سلول‌ها هم چون چرخه‌ی سلولی، آپوپتوز و تومور زایی ایفا می‌کنند (۱۲). تاکنون در برخی از مطالعات بیان ژن‌ها و میکرو RNA ها در بیماران مقاوم به تاموکسیفن مورد بررسی

مرتبط و یا ناکامل بودند، داده های مربوط به بیان ژن ها از مقالات جمع آوری شده به طور مستقل توسط دو نفر از نویسندگان بررسی گردید. در مرحله ی بعد داده هایی که از بررسی تغییرات بیانی ژن ها و میکرو RNA ها از پایگاه داده GEO دریافت شده بودند با داده های به دست آمده از مقالات مقایسه گردیده و به این ترتیب ژن ها و میکرو RNA های دخیل در مقاومت به تاموکسیفن مورد شناسایی قرار گرفتند. با بررسی در پایگاه GEO، داده های مربوط به دو مطالعه برای بررسی ژن های تغییر بیان یافته در افراد مبتلا به عود مجدد سرطان پستان که با تاموکسیفن درمان شده بودند دریافت گردید و همچنین ۶ مطالعه برای بررسی میکرو RNA های تغییر بیان یافته انتخاب شدند. با بررسی در پایگاه داده، ۲۰ مقاله برای ژن های تغییر بیان یافته، ۲۰ مقاله و ۵۰ مقاله برای میکرو RNA ها دریافت گردید که بعد از غربالگری و حذف مقالات غیرمرتبط و یا مقالات دارای داده های ناقص، برای بررسی تغییرات بیانی ژن ها ۱۵ مقاله و برای میکرو RNA ها ۲۰ مقاله انتخاب شد (شکل ۱).

جهت بررسی تغییرات بیان ژن ها و میکرو RNA ها در افراد حساس، نسبت به افراد مبتلا به عود مجدد سرطان پستان که با تاموکسیفن درمان شده اند، از پایگاه داده GEO به آدرس <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo> استفاده گردید، پایگاه داده GEO، داده اولیه مربوط به بیان ژن ها و میکرو RNA ها را در مطالعات مختلف در اختیار عموم قرار می دهد (۲۲). بعد از انتخاب مطالعات مربوطه (جدول ۱) فایل های داده با فرمت CEL از سایت دانلود گردید و توسط نرم افزار R و پکیج affy داده های هر نمونه قرائت گردید و بعد از اعتبار سنجی داده های دریافتی و نرمال نمودن آن ها با روش mas5 ضریب تغییرات ژن ها و میکرو RNA ها در نمونه های حساس و مقاوم به تاموکسیفن تعیین گردید. در مرحله بعد با جستجو در پایگاه های داده Scopus، PubMed، PMC و Google scholar، مقالاتی که در آن ها بیان ژن ها و میکرو RNA ها در افراد مقاوم به تاموکسیفن مورد بررسی قرار گرفته است دریافت شدند. پس از غربالگری مقالات و حذف مقالاتی که دارای اطلاعات غیر



کار کاهش داده شد. سطح معنی‌داری ۰/۰۵ به‌عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شده است. همچنین در نرم‌افزار mirwalk برای پیش‌بینی میانکنش بین ژن‌ها و میکرو RNA ها سطح معنی‌داری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. برای محاسبه‌ی آزمون‌های آماری از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ استفاده گردید و بعد از دریافت داده‌ها برای نرمال کردن آن‌ها و تعیین میزان تغییرات بیانی ژن‌ها و میکرو RNA ها از نرم‌افزار R و بسته affy و limma استفاده گردیده است.

یافته‌ها

با بررسی مقالات دریافت شده ۸ ژن افزایش بیان یافته و ۲۰ ژن کاهش بیان یافته و همچنین ۴۲ میکرو RNA ی افزایش بیان یافته و ۴۵ میکرو RNA ی کاهش بیان یافته شناسایی گردید. در مجموع با اطلاعات دریافت شده از پایگاه GEO، ۲۱ ژن افزایش بیان یافته و ۳۴ ژن کاهش بیان یافته و ۶۵ میکرو RNA ی افزایش بیان یافته و ۷۵ میکرو RNA ی کاهش بیان یافته شناسایی گردید. از مجموعه این ژن‌ها و میکرو RNA های که از مقالات و پایگاه GEO دریافت گردیده بود، ژن‌ها و میکرو RNA هایی که بیشترین تکرار در داده‌ها را داشتند و بیشترین تغییرات بیانی را دارا بودند برای ترسیم شبکه میانکنشی انتخاب گردیدند (جدول ۱).

با بررسی داده‌های دریافتی مشخص گردید که بین بیماران حساس و مقاوم به تاموکسیفن ۲۱ ژن دارای تغییرات بیانی معنی‌دار می‌باشند که از بین این، ژن‌های ABCB1، ABCC11، HOXB13، KLK3، RRM2، UBE2C افزایش بیان معنی‌دار و ژن‌های ATL1، CHDH، CRIM1، CGBP، LZTFL1، LRRC17، ITM2B، IL17RB، HIGD1A، FMO5، MTUS1، PKIB، SGK3، STC2، WFDC2 کاهش بیان را نشان دادند (شکل ۲).

از آنجایی که یکی از روش‌های تنظیم بیان ژن‌ها توسط میکرو RNA ها کاهش نسخه‌های هر ژن می‌باشد، وجود تغییرات بیانی معکوس بین ژن‌ها و میکرو RNA ها مورد بررسی قرار گرفت و بدین‌صورت ژن‌هایی که در بیماران دارای عود مجدد سرطان کاهش بیان یافته‌اند به‌عنوان اهداف تنظیمی احتمالی برای میکرو RNA هایی که در این افراد افزایش بیان یافته بودند در نظر گرفته شدند و همچنین به‌صورت معکوس ژن‌هایی که افزایش بیان یافته بودند به‌عنوان اهداف تنظیمی برای میکرو RNA هایی که کاهش بیان یافته بودند در نظر گرفته شدند. در مرحله بعد برای بررسی میانکنش مستقیم بین ژن‌های و میکرو RNA ها که دارای همبستگی منفی بودند از سایت mirwalk به آدرس <http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2/generetsys-self.html> استفاده گردید (۲۳). این نرم‌افزار میانکنش بین ژن‌ها و میکرو RNA ها را با استفاده از ۱۲ نرم‌افزار miRWalk، MicroT4، miRanda، mirbridge، miRDB، miRMap و miRNAmap، Pictar2، PITA، RNA22، RNAhybrid TargetsScan و بررسی می‌نماید و نتایج به‌صورت یک جدول به نمایش گذاشته می‌شود که به این‌صورت می‌توان تعیین نمود میانکنش مستقیم هر ژن با هر میکرو RNA به‌وسیله چند نرم‌افزار تایید می‌گردد. در شکل ۱ به صورت شماتیک مراحل انجام این بررسی نمایش داده شده است.

بعد از مشخص نمودن ژن‌ها و میکرو RNA هایی که در افراد مبتلا به عود مجدد سرطان تغییرات بیانی نشان داده‌اند و همچنین بررسی تغییرات بیانی معکوس بین ژن‌ها و میکرو RNA ها و تائید میانکنش مستقیم بین آن‌ها توسط نرم‌افزار mirwalk، برای ترسیم شبکه بین ژن‌ها و میکرو RNA هایی که میانکنش بین آن‌ها با روش‌های فوق تایید شده است از نرم‌افزار cytoscap استفاده گردید. برای بررسی تغییرات بیانی ژن‌ها و میکرو RNA ها در نمونه‌ها آزمون T استفاده شد و با استفاده آزمون FDR میزان خطای

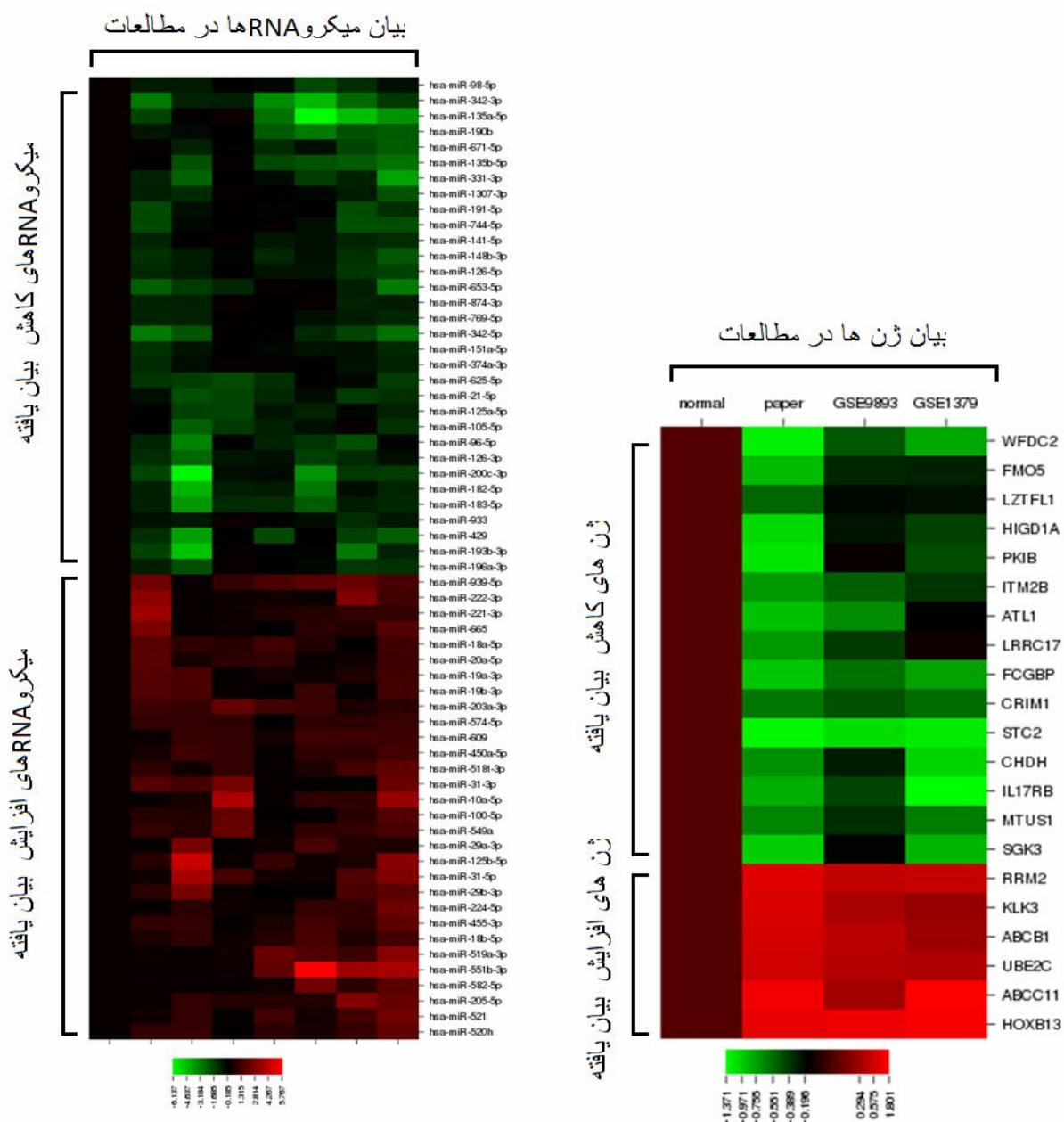
جدول ۱. شماره دسترسی مطالعات دریافت شده از پایگاه داده GEO به همراه تعداد ژن ها/ *microRNA* های تغییر بیان یافته

تعداد ژن/میکرو RNA کاهش بیان یافته	تعداد ژن/میکرو RNA افزایش بیان یافته	شماره بررسی
۵۱ میکرو RNA	۳۵ میکرو RNA	GSE66607
۳۵ میکرو RNA	۴۱ میکرو RNA	GSE56411
۴۲ میکرو RNA	۵۲ میکرو RNA	GSE46823
۷۰ میکرو RNA	۴۲ میکرو RNA	GSE37405
۴۶ میکرو RNA	۴۴ میکرو RNA	GSE28267
۴۰ میکرو RNA	۳۹ میکرو RNA	GSE17775
۲۴ ژن	۱۱ ژن	GSE1379
۲۶ ژن	۱۵ ژن	GSE9893
۲۰ ژن	۸ ژن	مقالات
۴۵ میکرو RNA	۴۲ میکرو RNA	
۳۴ ژن	۲۱ ژن	*تعداد کل
۷۵ میکرو RNA	۶۵ میکرو RNA	
۱۵ ژن	۶ ژن	تعداد انتخاب شده
۳۲ میکرو RNA	۳۰ میکرو RNA	

* برخی از ژن ها/ *microRNA* ها در مطالعات مختلف همپوشان می باشند به همین دلیل تعداد کل از مجموع مطالعات کمتر می باشد.

مربوط به ژن STC2 با تغییرات بیانی ۰/۲۸۷ برابری
($P=0/0002$) می باشد (شکل ۳).

بیشترین افزایش بیان مربوط به ژن HOXB13 با تغییرات بیانی
۲/۵۸ برابری ($P=0/0012$) و بیشترین کاهش بیان در نمونه ها

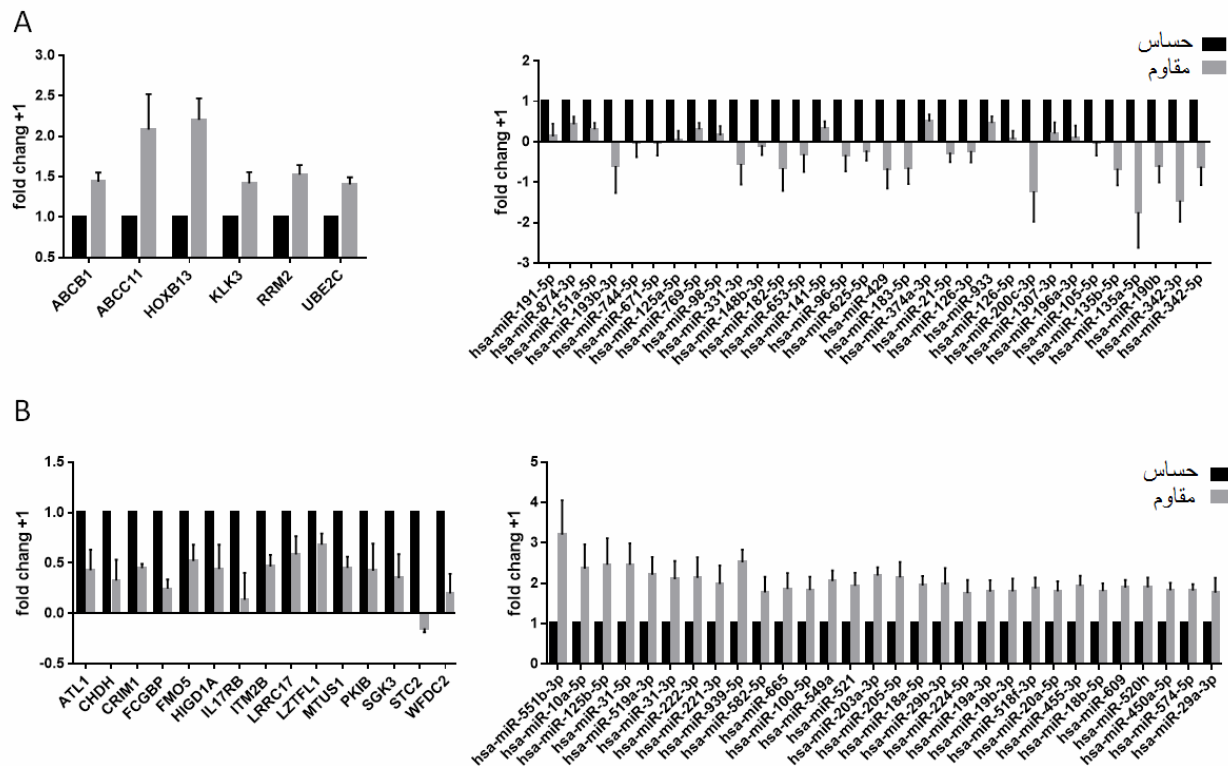


شکل ۲. تغییرات بیانی ژن ها در نمونه های سرطانی عود مجدد درمان شده با تاموکسیفن به نمونه های حساس. بیان ژن ها و میکروRNAهای تغییر بیان یافته در مطالعات مختلف قابل مشاهده می باشند. رنگ سبز به معنی کاهش بیان و رنگ قرمز به معنی افزایش بیان ژن در مطالعه می باشد.

، 549a.31-3p، 222-3p بیشترین افزایش بیان (بالای ۲ برابر و $p < 0.05$) و میکروRNAهای 342-3p، 135a-5p، 200c-3p، 190b، 193b-3p، 342-5p، 183-5p، 182-5p، 429، 135b-5p،

در بین میکروRNAهایی که در نمونه های مقاوم به تاموکسیفن بیشترین تغییرات را نشان داده اند 939-551b-3p، 205-5p، 203a-3p، 519a-3p، 10a-5p، 31-5p، 125b-5p، 5p

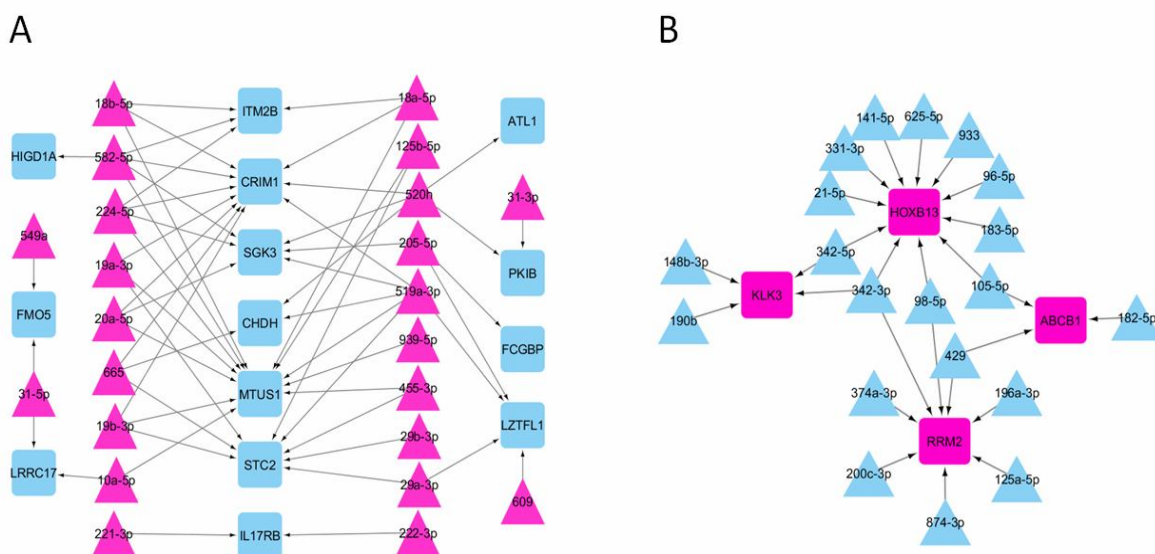
RNA های انتخاب شده می باشد. به صورتی که ژن هایی که تغییرات بیانی معکوس با میکرو RNA ها نشان داده اند در قسمت های A و B تفکیک شده اند.



شکل ۳. میران تغییرات بیانی ژن ها و میکرو RNA ها در بافت سرطان پستان افراد مبتلا به عود مجدد بیماری نسبت به افراد حساس به تاموکسیفن. قسمت A ژن های افزایش بیان یافته به همراه میکرو RNA های کاهش بیان یافته. قسمت B ژن های کاهش بیان یافته به همراه میکرو RNA های افزایش بیان یافته.

RRM2 دارا می باشد. همچنین نرم افزار mirwalk برای ۱۴ ژن کاهش بیان یافته و ۲۳ میکرو RNA افزایش بیان یافته ۱۳۵ میانکشی ($P < 0.05$) را پیش بینی می نماید، از بین میکرو RNA ها miR-519a-3p با ۶ ژن CHDH، CRIM1، CHDH، ATL1، LZTFL1، MTUS1، SGK3، STC2 و miR-520h با ۵ ژن SGK3، PKIB، CRIM1، CHDH، ATL1 میانکشی معنی دار دارند (شکل A۴).

با بررسی هایی که با نرم افزار mirwalk صورت گرفت مشخص گردید که برای ۴ ژن افزایش بیان یافته klk3، ABCB1، hoxb13 و RRM2 با ۲۰ میکرو RNA های کاهش بیان یافته، ۲۵ میانکشی مستقیم پیش بینی شده است ($P < 0.05$) (شکل B۴) که این پیش بینی ها حداقل توسط ۵ نرم افزار تأیید شده اند. از بین این میکرو RNA ها miR-342-3p سه میانکشی مستقیم با ژن ها klk3، hoxb13 و



شکل ۴. شبکه تنظیمی میانکنشی بین میکروRNAها و ژنهایی که در عود سرطان پستان درمان شده با تاموکسیفن نقش دارند. قسمت A ارتباط تنظیمی بین ژنهای کاهش بیان یافته و میکروRNAهای افزایش بیان یافته که با نرم افزار mirwalk تایید شده اند. قسمت B ارتباط تنظیمی بین ژنهای افزایش بیان یافته و میکروRNAهای کاهش بیان یافته که با نرم افزار mirwalk تایید شده اند

بحث

بیوانفورماتیکی شبکه میانکنشی ژن ها و میکروRNAهای دخیل در سرطان ریه و اندومتریال کارسینوما ترسیم گردیده است (۲۶). در سال ۲۰۰۹ شبکه های میانکنشی برای ژن ها و میکروRNAهای دخیل در بیماری میلوما ترسیم شده است (۲۷) و در سال های اخیر مقالات بیوانفورماتیکی مشابه رو به افزایش بوده است (۲۸). در بررسی حاضر شبکه میانکنشی بین ژن ها و میکروRNAهای دخیل در عود مجدد سرطان پستان که با تاموکسیفن درمان شده اند، به وسیله بررسی تغییرات بیانی آن ها در پایگاه های داده GEO و مقالات و سپس با استفاده از نرم افزار بیوانفورماتیکی mirwalk ترسیم شده است. بررسی حاضر نشان داده است که بیان ۴ ژن *KLK3*، *RRM2*، *hoxb13*، *ABCB1* در افراد مبتلا به عود مجدد سرطان پستان افزایش بیان یافته است (شکل ۳) همچنین این بررسی نشان داده که بیان این چهار ژن دارای الگوی بیانی معکوس با ۲۰ میکروRNA می باشند (شکل ۳) که این میکروRNAها کاهش بیان بیشتر از دو برابری دارند

بسیاری از مطالعات اخیر نقش حیاتی میکروRNAها را در مقاومت به داروها و یا پاسخ به سرطان نشان داده اند و در سرطان پستان نیز نقش میکروRNAها در مقاومت به تاموکسیفن، از طریق کنترل پروتئین های تنظیم کننده چرخه سلولی، مطرح شده است (۲۴ و ۲۵). از سویی میکروRNAها می توانند ژن های مختلفی را تنظیم نمایند که در بروز و یا سرکوب سرطان ها دارای نقش می باشند، بنابراین پیش بینی بیوانفورماتیکی میانکنش بین ژن ها و میکروRNAها می تواند یک راهکار مؤثر در شناسایی ژن های هدف میکروRNAها و ترسیم مسیرهای سلولی دخیل در سرطان زایی و مقاومت به داروها باشد که راه را برای بررسی های آزمایشگاهی آشکار می نماید (۲۱). تاکنون مطالعات زیادی برای بررسی و ترسیم شبکه های میانکنشی ژن ها و میکروRNAها به روش های بیوانفورماتیکی در سرطان های مختلف انجام گرفته است. به عنوان مثال در سال ۲۰۱۶ با روش های آماری و

(شکل ۲ و ۳) همچنین میانکشی این چهار ژن با ۲۰ میکرو RNA توسط حداقل پنج نرم افزار در سایت mirwalk تأیید شده است ($P < 0.05$) (شکل ۴B).

در بین این ۴ ژن افزایش بیان یافته، ژن HOXB13 دارای بیشترین ارتباط تنظیمی با میکرو RNA ها می باشد به صورتی که ۱۱ میکرو RNA می توانند بر بیان آن تأثیر بگذارند (شکل ۴) بنابراین تغییرات بیانی (کاهش بیان) این میکرو RNA ها به صورت هم زمان می تواند سبب افزایش بیان ژن HOXB13 گردد. بررسی ها نشان داده که ژن HOXB13 از طریق کاهش رونویسی ژن ERα و بیان این پروتئین و فعال سازی مسیر mTOR در مقاومت به تاموکسیفن و متاستاز سرطان نقش دارد (۲۹) یائو و همکاران نیز در سال ۲۰۰۴ با بررسی تغییرات بیانی ژن HOXB13 گزارش نمودند که این ژن در افراد مبتلا به عود سرطان پستان که با تاموکسیفن درمان شده بودند، افزایش بیان نشان می دهد (۱۷). مطالعاتی که بر روی سرطان تخمدان صورت گرفته است نشان می دهد که بیان ترکیبی KLK3، KLK4، KLK5، KLK6 و KLK7 سبب عدم حساسیت به داروی paclitaxel می گردد که این نشان دهندهی نقش KLK3 در مقاومت دارویی از طریق کاهش چسبندگی بین سلولی می باشد (۳۰). ژن ABCB1 نیز یکی از دلایل اصلی عدم موفقیت در شیمی درمانی بیماران سرطانی می باشد که از طریق خروج دارو از سلول توسط پمپ های وابسته به ATP می تواند سبب خنثی شدن اثر دارو بر روی سلول سرطانی گردد. و ال های خاصی از این ژن می تواند سبب کوتاه تر شدن زمان عود سرطان پستان گردد (۳۱).

در بررسی کنونی علاوه بر ژن های افزایش بیان یافته در شبکه میانکشی، بیان ۱۴ ژن نیز کاهش یافته (شکل ۲ و ۳) که بیان آن ها می تواند توسط ۲۳ میکرو RNA افزایش بیان یافته، تنظیم گردد (شکل ۴). در بین ۱۴ ژن های کاهش بیان یافته (شکل ۳B) ژن های MTUS1 و CRIM1 دارای بیشترین

میانکشی با میکرو RNA های افزایش بیان یافته می باشند (به ترتیب با ۱۲ و ۱۰ میانکشی) (شکل 4A) بنابراین کاهش بیان این ژن ها می تواند یک عامل تعیین کننده در عود مجدد سرطان پستان باشد. بررسی ها نشان داده ژن های MTUS1 و CRIM1 به عنوان ژن های سرکوبگر تومور در سرطان پستان معرفی شده اند و ژن MTUS1 می تواند با ممانعت از تقسیم سلولی مانع از تکثیر سرطان گردند (۳۲). علاوه بر این در یک بررسی در سال ۲۰۰۸ که توسط الکساندرا و همکاران صورت گرفته بود، بیان ژن های MTUS1 و CRIM1 در ۱۳۵ بیمار مبتلا به سرطان پستان که به مدت ۵ سال به وسیله تاموکسیفن درمان شده بودند، کاهش یافته گزارش گردید (۱۹).

از دیگر ژن های کاهش بیان یافته که توسط میکرو RNA ها افزایش بیان یافته هدف قرار می گیرند (شکل ۴A) ژن های SGK3، PKIB، FMO5، STC2، CHDH، JL17BR، LZTFL1 و LRRC17، TM2B، HIGD1A، FCGBP می باشند که همگی جزء ژن های سرکوب کنندهی تومر دسته بندی می گردند و فعالیت های سلولی مانند سرکوب رشد غیر کنترل شده سلولی، چسبندگی سلولی، مهاجرت سلول ها، پاسخ ایمنی و بقای سلولی را کنترل می نمایند (۱۸).

در مطالعهی حاضر از بین میکرو RNA هایی که کاهش بیان یافته اند (شکل ۳) miR-342-3p سه میانکشی مستقیم با ژن ها klk3، hoxb13 و RRM2 دارا می باشد (شکل ۴) و به نظر می رسد که دارای نقش مهمی در عود سرطان پستان می باشد. میکرو RNA های miR-429، miR-98-5p، miR-105-5p و miR-342-5p نیز هر کدام می توانند دو ژن هدف را تنظیم نمایند (شکل ۴). میکرو RNA های miR-342-5p و miR-342-3p هر دو متعلق به خانواده mir-342 می باشند که در یک لوکوس قرار گرفته اند و هر دو از یک پیش ساز میکرو RNA سنتز می گردند و دارای دو ژن هدف مشترک به نام های klk3 و hoxb13 می باشند، بنابراین کاهش بیان ژن حاوی پیش ساز این دو میکرو RNA

بررسی پروفایل میکروRNAها در رده‌های سلولی مقاوم به تاموکسیفن که از بافت سرطانی پستان مشتق شده بودند، گزارش نمودند که بیان *miR-519a-3p*، *MiR-520h* و *miR-224-5p* در رده سلولی مقاوم افزایش بیان یافته است (۳۴) که با نتایج بررسی حاضر مطابقت دارد.

نتیجه‌گیری

در این بررسی شماری از ژن‌ها و میکروRNAهای تغییر بیان یافته در مقاومت به تاموکسیفن شناسایی گردیده‌اند که در مسیرهای مهم سلولی مانند رشد غیر کنترل شده سلولی، چسبندگی سلولی، مهاجرت سلول‌ها، پاسخ ایمنی، بقای سلولی و پاسخ به استروژن‌ها تاثیرگذار می‌باشند. بنابراین ترسیم شبکه میانکنشی بین ژن‌ها و میکروRNAهای فوق راه را برای شناسایی مکانیسم‌های عود مجدد سرطان پستان فراهم می‌آورد.

References

- 1- Enayatrad M, Amoori N, Salehiniya H. Epidemiology and trends in breast cancer mortality in Iran. *Iran J Public Health*. 2015; 44:430-31.
- 2- Jemal A, Siegel R, Xu J. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2010; 60: 277-300.
- 3- Banerjee S, Saxena N, Sengupta K, et al. 17alpha-estradiol-induced VEGF-A expression in rat pituitary tumor cells is mediated through ER independent but PI3K-Akt dependent signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003; 300: 209-15.
- 4- Musgrove EA, Sutherland RL. Biological

می‌تواند در عود سرطان پستان دخیل باشد. در سال ۲۰۱۱ ماناوالان با بررسی پروفایل میکروRNAها در رده‌های سلولی گرفته‌شده از بافت سرطانی پستان که مقاوم به تاموکسیفن بودند گزارش نمودند که بیان *miR-342-5* و *miR-342-3p* در رده سلولی مقاوم به ترتیب ۱۰ و ۷ برابر کاهش یافته است (۳۳) همچنین وارد و همکاران در سال ۲۰۱۳ گزارش نمودند که *miR-342-3p* در بافت مقاوم به تاموکسیفن ۳ برابر کاهش بیان یافته است (۳۴)، همچنین ایکدا و همکاران در سال ۲۰۱۵ با بررسی پروفایل میکروRNAها در دو رده سلولی مقاوم به تاموکسیفن کاهش بیان *miR-342-3p* را در رده‌های مقاوم به تاموکسیفن گزارش نموده‌اند (۳۵). از بین میکروRNAهایی افزایش بیان یافته (شکل ۳) *miR-519a-3p* با ۶ ژن و *MiR-520h* و *miR-582-5p* هر کدام با ۵ ژن هدف و *miR-224-5p* با داشتن ۴ ژن هدف (شکل 4A) می‌تواند بیشترین نقش را کاهش بیان ژن‌های هدف ایفا نمایند. در سال ۲۰۱۳ وارد و همکاران با

- determinants of endocrine resistance in breast cancer. *Nature Reviews Cancer* 2009; 9:631-43.
- 5- Chang XZ, Li DQ, Hou YF, et al. Identification of the functional role of peroxiredoxin 6 in the progression of breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2007; 9: 76-85.
 - 6- Shou J, Massarweh S, Osborne CK. Mechanisms of tamoxifen resistance: increased estrogen receptor-HER2/neu cross-talk in ER/HER2-positive breast cancer. *J Nat Cancer Inst*. 2004; 96: 926 -35.
 - 7- Rubí v, Luis B, Fabio S. Mechanisms associated with resistance to tamoxifen in

- estrogen receptor-positive breast cancer (Review). *Oncology reports*, 2014; 32: 3-15.
- 8- Mosselman S, Polman J, Dijkema R. ER β : identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett.* 1996; 392: 49-53.
- 9- Dixon D, Couse JF, Korach KS. Disruption of the estrogen receptor gene in mice. *Toxicol Pathol.* 1997; 25: 518-20.
- 10- Croce CM. Oncogenes and cancer. *N Engl J Med.* 2008; 358: 502-11.
- 11- Filipowicz W, Bhattacharyya S, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight. *Nat Rev Genet.* 2008; 9: 102-14.
- 12- Gao FB. Context-dependent functions of specific microRNAs in neuronal development. *Neural Develop.* 2010; 5: 25-6.
- 13- Tyler E, Ghoshal K, Ramaswamy B. MicroRNA-221/222 confers tamoxifen resistance in breast cancer by targeting p27Kip1. *J Biol Chem.* 2008; 283: 29897-903.
- 14- Aamir A, Kevin R, Ginnebaugh1, et al. Functional role of miR-10b in tamoxifen resistance of ER-positive breast cancer cells through down-regulation of HDAC4. *BMC Cancer.* 2015; 15: 540-51.
- 15- Jiang Z, Zhengzhi Z, Peipei N. Downregulation of microRNA-27b-3p enhances tamoxifen resistance in breast cancer by increasing NR5A2 and CREB1 expression. *Cell Death Disease.* 2016; 7: 2454-64.
- 16- Mingrong L, Keshuo D, Guofeng Z, et al. MicroRNA-320a sensitizes tamoxifen-resistant breast cancer cells to tamoxifen by targeting ARPP-19 and ERRC. *Sci Repotrs.* 2015; 5: 8735-45.
- 17- Xiao JM, Zuncai W, Paula D, Ryan, SJ. A two-gene expression ratio predicts clinical outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen. *Cancer Cell.* 2004; 5: 607-16.
- 18- MaI C, Vincent N, Heole'ne F. A gene expression signature that can predict the recurrence of tamoxifen-treated primary breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2008; 14: 1744-52.
- 19- Aoife W, Kirti S, Aleksandra B. MicroRNA-519a is a novel oncomir conferring tamoxifen resistance by targeting a network of tumour-suppressor genes in ER+ breast cancer. *J Pathol.* 2014; 233: 368-79
- 20- Tejal J, Daniel E, Jan St. Integrative analysis of miRNA and gene expression reveals regulatory networks in tamoxifen-resistant breast cancer. *Oncotarget.* 2016; 7: 57239-57253.3
- 21- Daya L, James MW, Nikki H. A systematic evaluation of miRNA:mRNA interactions involved in the migration and invasion of breast cancer cells. *J Trans Med.* 2013; 11: 57-67.
- 22- Barrett T, Wilhite SE, Ledoux P, et al. NCBI GEO: archive for functional genomics data sets--update. *Nucleic Acids Res.* 2013; 41: 991-5.
- 23- Dweep H. miRWalk - database: prediction of possible miRNA binding sites by "walking" the genes of 3 genomes. *J Biomed Inform.* 2011; 44: 839-7.

- 24- Ciafrè SA, Galardi S, Mangiola A. Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. *Biochem Biophys Res Communv.* 2005; 334: 1351-58.
- 25- Pallante P, Visone R, Ferracin M, et al: MicroRNA deregulation in human thyroid papillary carcinomas. *Endocr Relat Cancer.* 2006; 13: 497-508.
- 26- Hanzhen X, Qiulian L, Ruichao C. A multi-step miRNA-mRNA regulatory network construction approach identifies gene signatures associated with endometrioid endometrial carcinoma. *Genes.* 2016; 7: 1-11.
- 27- Marta L, Marta B, Luca A, Katia T, Laura M. Identification of microRNA expression patterns and definition of a microRNA/mRNA regulatory network in distinct molecular groups of multiple myeloma. *Blood.* 2009; 114: 20-26.
- 28- Ruiqi M, Chenyu W, Junjian W, Dong W. MiRNA-mRNA Interaction Network in Non-small Cell Lung Cancer. *Interdiscip Sci Comput Life Sci.* 2016; 8: 209-19.
- 29- Shah N1, Jin K, Cruz LA. HOXB13 mediates tamoxifen resistance and invasiveness in human breast cancer by suppressing ER α and inducing IL-6 expression. *Cancer Res.* 2013; 73:5449-58.
- 30- Daniela L, Verena MC, Eva C. Combined expression of KLK4, KLK5, KLK6, and KLK7 by ovarian cancer cells leads to decreased adhesion and paclitaxel-induced chemoresistance. *Gynecol Oncol.* 2012; 569-78.
- 31- Teh LK, Mohamed NI, Salleh MZ. The risk of recurrence in breast cancer patients treated with tamoxifen: Polymorphisms of CYP2D6 and ABCB1. *AAPS J.* 2012; 14: 52-59.
- 32- Sylvie RF, Anne DT, Ariane D, Sylvie C. 8p22 MTUS1 gene product ATIP3 is a novel anti-mitotic protein underexpressed in invasive breast carcinoma of poor prognosis. *PLoS ONE.* 2009; 4: 7239-49.
- 33- Manavalan TT, Teng Y. Differential expression of microRNA expression in tamoxifensensitive MCF-7 versus tamoxifen-resistant LY2 human breast cancer cells. *Cancer Lett.* 2011; 313: 26-43.
- 34- Ward A, Balwierz A, Zhang JD, Ku M. Re-expression of microRNA-375 reverses both tamoxifen resistance and accompanying EMT-like properties in breast cancer. *Oncogene.* 2013; 32: 1173-82.
- 35- Ikeda K, Kuniko H, Toshihide U, Takashi S. MiR-378a-3p modulates tamoxifen sensitivity in breast cancer MCF-7 cells through targeting GOLT1A. *Sci Reports.* 2015; 5: 13170-79.

The Bioinformatics Study of the Interactions between MicroRNAs and Genes Involved in Relapse of breast Cancer Treated with Tamoxifen

Ramazi SH¹, Iziy E², Fasihi A¹, Ghasemi-Dehkordi P³

¹Cellular and Molecular Research Center, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzevar, Iran

²Traditional and Complementary Medicine Research Center, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzevar, Iran

³Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

Corresponding Author: Ramazi SH, Cell and Molecular Research Center, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzevar, Iran

E-mail: shahinramazi@yahoo.com

Received: 11 Apr 2016 **Accepted:** 19 Jul 2017

Background and Objective: Tamoxifen is the most commonly used treatment for the patients with breast cancer called ER +, which prevents the expression of genes that are effective in the growth and proliferation of cancer cells by estrogen. Resistant to Tamoxifen is a major clinical problem in breast cancer treatment. In recent studies, the role of microRNAs in tamoxifen resistance has been raised through the influence of regulation of cell cycle control genes. Throughout this study, the interactions of microRNAs with genes involved in tamoxifen resistance were investigated.

Materials and Methods: By comparing the gene expression data in samples of patients sensitive and resistant to Tamoxifen from the GEO database and searching in the database of articles, genes and microRNAs with significant expression variations were determined. Then, by examining the correlation between the expression of genes and microRNAs and bioinformatics by mirwalk software, the interconnection network between the genes and microRNAs was drawn.

Results: The results showed that 21 genes and 62 microRNAs altered in Tamoxifen resistant specimens. With miR342-3P/5P targeting the HOXB13, PRM2, and KLK3 genes, and MiR-520h and miR-582-5p microRNAs, targeting 5 reduced expression genes, can lead to recurrence of breast cancer.

Conclusion: The regulatory network mapped out between a set of genes and microRNAs that are potentially involved in the recurrence of breast cancer treated with Tamoxifen could clarify the role of the microRNAs in the recurrence of breast cancer.

Key words: Breast cancer, Tamoxifen, Relapse, Interconnecting network, MicroRNA, Bioinformatics